

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA I UKUPNIH FENOLA IZ
RUŽMARINA, KADULJE, ORIGANA I TIMIJANA NAKON POSTUPKA
INKAPSULACIJE**

ZAVRŠNI RAD

MARIJA ČULINA

Matični broj: 302

Split, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA

**ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA I UKUPNIH FENOLA IZ
RUŽMARINA, KADULJE, ORIGANA I TIMIJANA NAKON POSTUPKA
INKAPSULACIJE**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Tea Bilušić

MARIJA ČULINA

Matični broj: 302

Split, rujan, 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

**DETERMINATION OF VOLATILE COMPOUNDS FROM ROSEMARY,
SAGE, OREGANO AND THYME AFTER ENCAPSULATION**

BACHELOR THESIS

MARIJA ČULINA

Matični broj: 302

Split, September, 2018

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij Kemija

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: prof. dr. sc. Tea Bilušić

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA I UKUPNIH FENOLA IZ RUŽMARINA, KADULJE, ORIGANA I TIMIJANA NAKON POSTUPKA INKAPSULACIJE

Marija Čulina, 302

Sažetak: Brojna su istraživanja potvrdila korisno djelovanje ružmarina, kadulje, origana i timijana na ljudski organizam. Njihovo djelovanje potječe od bogatog sastava biološki aktivnih spojeva. Cilj ovoga rada bio je odrediti sastav hlapivih komponenti navedenih biljaka nakon postupka inkapsulacije koristeći dva nosača (protein sirutke i protein soje). Korištena tehnika za određivanje hlapivih komponenti bila je plinska kromatografija vezana uz masenu spektrometriju s mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi, GC-MS-SPME a za određivanje ukupnih fenola koristila se spektrofotometrijska metoda Folin-Ciocalteu. Dobiveni rezultati pokazuju da se kemijski sastav hlapljivih komponenti navedenih biljaka razlikuje s obzirom na vrstu proteinskog nosača.

Ključne riječi: hlapljivi spojevi, fenoli, inkapsulacij, proteini soje, proteini sirutke

Rad sadrži: 31 stranica, 22 slika, 2 tablica, 0 priloga, 25 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva: 1. doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović predsjednik

2. doc. dr. sc. Franko Burčul član

3. prof. dr. sc. Tea Bilušić član-mentor

Datum obrane: 21. rujna 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom(pdf formatu) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Undergraduate study of Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.

Mentor: Tea Bilušić, PhD, Full Professor

Technical assistance: Zvonimir Marijanović, PhD Assistant Professor

DETERMINATION OF VOLATILE COMPOUNDS FROM ROSEMARY, SAGE, OREGANO AND THYME AFTER ENCAPSULATION

Marija Čulina, 302

Abstract: Many studies have confirmed the positive effect of rosemary, sage, oregano and thyme on the human organism. Their activity stems from the rich composition of biologically active compounds. The main purpose of this work was determination of the composition of the volatile components of the above mentioned plants after encapsulation using two carriers (whey proteins and soy proteins). The technique used to determine the volatile components was gas chromatography related to mass spectrometry with solid phase microextraction GC-MS-SPME, but for the determination of total phenol a spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu was used. The results show that the chemical composition of the volatile components of mentioned plants varies with the type of protein carrier.

Keywords: volatile compounds, phenols, encapsulation, whey proteins, soy proteins

Thesis contains: pages, 22 figures, 2 tables, 0 supplements, 25 references

Original in: Croatian

Defence committee: 1. Zvonimir Marijanović - PhD, Assistant Professor chair person

2. Franko Burčul- PhD, Assistant Professor member

3. Tea Bilušić– PhD, Full Professor supervisor

Defence date: 21. rujna 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

Završni rad je izrađen u Zavodu za Prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof.dr.sc Tee Bilušić od veljače do rujna 2018. godine.

Rad je financiran od HRZZ projekata „Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane“ (IP-2013-11-3035) te „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa „zelenim otapalima“ primjenom visokonaponskog pražnjenja“ (IP-2016-06-1913).

ZAHVALA

Iskrenu zahvalu želim posvetiti prvenstveno svojoj mentorici, prof.dr.sc. Tei Bilušić na izdvojenom vremenu, trudu, strpljenju te prenesenom znanju koji su mi pomogli pri izradi ovog završnog rada.

Također se želim zahvaliti i doc.dr.sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći pri analizama hlapljivih spojeva iz biljnih uzoraka, dr.sc. Ivani Drvenici i dr.sc. Ani Kalušević sa Sveučilišta u Beogradu na pomoći oko izrade inkapsuliranih uzoraka vodenih ekstrakata biljaka.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Glavni cilj ovog istraživanja bilo je određivanje hlapljivih komponenti iz uzoraka aromatičnih biljaka karakterističnih za područje Dalmacije i Mediteransku prehranu (ružmarina, kadulje, timijana i origana) tehnikom plinske kromatografije vezane uz spektrometriju masa i mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (GC/MS-SPME) nakon postupka inkapsulacije na dva različita nosača (proteini soje i proteini sirutke). Nadalje, cilj rada bio je odrediti udio ukupnih fenola spektrofotometrijskom metodom Folin-Ciocalteu u inkapsuliranim biljnim uzorcima.

SAŽETAK

Brojna su istraživanja potvrdila korisno djelovanje ružmarina, kadulje, origana i timijana na ljudski organizam. Njihovo djelovanje potječe od bogatog sastava biološki aktivnih spojeva. Cilj ovoga rada bio je odrediti sastav hlapivih komponenti navedenih biljaka nakon postupka inkapsulacije koristeći dva nosača (protein sirutke i protein soje). Korištena tehnika za određivanje hlapivih komponenti bila je plinska kromatografija vezana uz masenu spektrometriju s mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi, GC-MS-SPME a za određivanje ukupnih fenola koristila se spektrofotometrijska metoda Folin-Ciocalteu. Dobiveni rezultati pokazuju da se kemijski sastav hlapljivih komponenti navedenih biljaka razlikuje s obzirom na vrstu proteinskog nosača.

Ključne riječi: hlapljivi spojevi, fenoli, inkapsulacija, proteini soje, proteini sirutke

SUMMARY

Many studies have confirmed the positive effect of rosemary, sage, oregano and thym on the human organism. Their activity stems from the rich composition of biologically active compounds. The main purpose of this work was determination of the composition of the volatile components of the above mentioned plants after encapsulation using two carriers (whey proteins and soy proteins). The technique used to determine the volatile components was gas chromatography related to mass spectrometry with solid phase microextraction GC-MS-SPME, but for the determination of total phenol a spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu was used. The results show that the chemical composition of the volatile components of mentioned plants varies with the type of protein carrier.

Keywords: volatile compounds, phenols, encapsulation, whey proteins, soy proteins

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Začinsko i aromatično bilje Mediterana.....	3
2.1.1. RUŽMARIN	3
2.1.2. KADULJA	5
2.1.3. ORIGANO	6
2.1.4. TIMIJAN	8
2.2. Biološki aktivni spojevi iz aromatičnog i začinskog bilja	9
2.2.1. HLAPIVI SPOJEVI.....	9
2.2.2. FENOLNI SPOJEVI.....	9
2.3. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi i plinska kromatografija	11
2.4. Tehnike inkapsulacije u cilju stabilizacije biološki aktivnih spojeva	16
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. Uzorci	19
3.2. Postupak inkapsulacije	19
3.3. Određivanje hlapivih spojeva iz uzoraka	20
3.4. Određivanje udjela ukupnih fenola	22
4. REZULTATI	24
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČAK.....	29
7. LITERATURA	30

1. UVOD

Široku primjenu u svakodnevnom životu pronašla su ljekovita bilja koja su se od davnina koristila za liječenje raznih bolesti i u kulinarstvu. Svoju primjenu su zadržala i u suvremenom životu naročito u farmaceutske ili kozmetičke svrhe. Biološki aktivne tvari uzrok su pozitivnog djelovanja tih biljaka na ljudski organizam. Porodica bilja koja se ističu svojim pozitivnim učinkom naziva se porodica *Lamiaceae* tkzv. Usnače, a ime nosi po vjenčiću koji je građen u obliku gornje i donje usne. Biljke iz ove porodice sadrže eterična ulja. U Hrvatskoj se pojavljuju na području Sredozemlja pošto su to biljke koje vole toplu klimu. Neki od poznatih predstavnika su: metvica (lat. *Mentha longifolia* (L.) Huds), lavanda (lat. *Lavandula angustifolia* Mill.), origano ili mažuran (lat. *Origanum vulgare* L.), ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis* L.), timijan (lat. *Thymus vulgaris* L.), bosiljak ili murtela (lat. *Ocimum basilicum* L.), kadulja ili ljekovita žalfija (lat. *Salvia officinalis* L.), ljekoviti matičnjak (lat. *Melissa officinalis* L.).

Biljke koje su se koristile za ovo istraživanje spadaju u aromatične biljke koje sadrže aktivne tvari, a upravo one im daju specifičan miris i aromu. Aktivne tvari u aromatičnom bilju su alkaloidi, kiseline, eterična ulja, glikozidi, ljepljive sluzi, tanini, vitamini, smole, minerali i gorke tvari¹.

Ružmarin je začinska, aromatična i ljekovita biljka, raširena na Hvaru, Šolti, Visu, Korčuli. Zbog fenolnih spojeva ima izražena antioksidacijska svojstva. Kadulja ima antiseptička djelovanja zbog sadržaja tujona u svom sastavu. Origano sadrži i vitamine A i C. Antimikrobno djelovanje origana pripisuje se fenolnom spoju, karvakrolu. Timijan sadrži snažan antiseptik, timol. Osim navedenog, dobar je za dišni sustav.

Na kvalitetu aktivnih komponenti ljekovitog bilja mogu utjecati razni čimbenici kao što su svjetlost, temperatura, ekološki činioci, geografska širina, voda, tlo, natapanje te način i vrijeme berbe. Što se tiče podjele razlikuju se primarne aktivne tvari (šećeri i proteini) te sekundarne aktivne tvari ili biološki aktivne tvari koje sadrže alkaloide, organske kiseline, eterična ulja, glikozide, biljne ljepljive sluzi, gume, smole, tanin, vitamine i drugi. Primarne aktivne tvari su nužne biljci za rast i reprodukciju, a sekundarne ne utječu izravno na razvoj biljke.

Od aromatičnih biljaka često se proizvode eterična ulja, a ona predstavljaju smjesu različitih organskih spojeva. Eterična ulja se upotrebljavaju za proizvodnju mirisa, aroma, pića i začina, ali se često koristi i njihovo farmakodinamičko djelovanje². Miris bilja potječe od organskih spojeva alkohola, estera, fenola, aldehida, ketona, terpena i drugih. Svježe izolirana eterična ulja su bezbojne tekućine ili blijedo žućkaste tekućine, a samo mali broj ih je obojen. Potpuno su hlapiva i nemaju ostataka, a topljivost u vodi im je vrlo mala (1:200). Fenolni spojevi u eteričnim uljima smatraju se najodgovornijima za antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja.

Fenolni spojevi uvrštavaju se u sekundarne metabolite. Najviše se upotrebljavaju kao prehrambene boje i antioksidansi. Dodaju se prehrambenim proizvodima radi produljivanja roka trajanja i snižavanja rizika izlaganja ljudskog zdravlja slobodnim radikalima. Najvažnija podjela im je na fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline) i flavonoide (flavonoli, flavoni, flavanoni, flavan-3-oli, izoflavoni i antocijanidini). Imaju antioksidacijsko djelovanje, a ono je određeno sposobnošću stabilizacije slobodnih radikala.

Glavni cilj ovog istraživanja bilo je određivanje hlapljivih komponenti iz uzoraka aromatičnih biljaka karakterističnih za područje Dalmacije i Mediteransku prehranu (ružmarina, kadulje, timijana i origana) tehnikom plinske kromatografije vezane uz spektrometriju masa i mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (GC/MS-SPME) nakon postupka inkapsulacije na dva različita nosača (proteini soje i proteini sirutke).

2. OPĆI DIO

2.1. Začinsko i aromatično bilje Mediterana

2.1.1. RUŽMARIN

CARSTVO: Plantae

RED: Lamiales

PORODICA: Lamiceae

ROD: Rosmarinus L.

VRSTA: *Rosmarinus Officinalis* L.



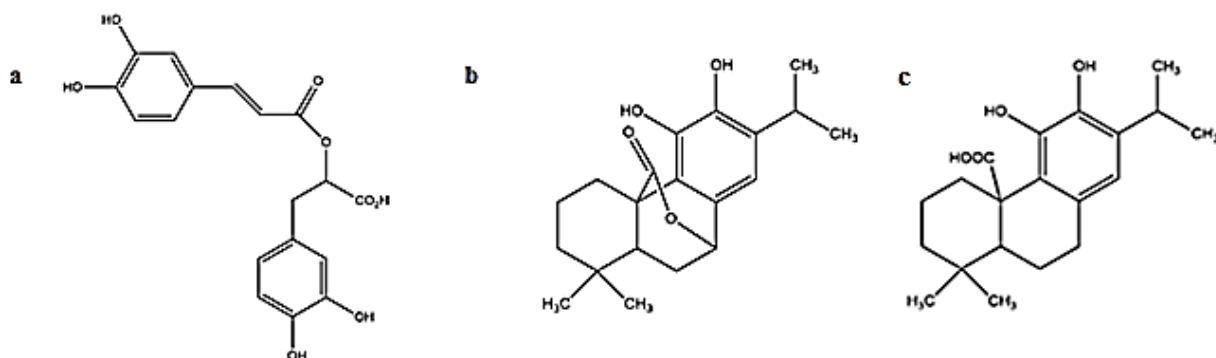
Slika 1. Ružmarin

Lat. *Salvia rosmarinus* L., što u prijevodu znači "morska rosa". Ova biljka voli sunčane i kamenite krajeve, bogate kalcijem. Rasprostranjen je po cijelom Mediteranu, sve do Bliskog istoka, a što se Hrvatske tiče duž obale te na otocima. Unutar populacije ružmarina na području Dalmacije utvrđeno je nekoliko tipova³. U stara vremena se vjerovalo kako miris ružmarina poboljšava pamćenje, a to su i dokazali znanstvenici sveučilišta Cincinnati.

Ružmarin potiče cirkulaciju i tok krvi prema mozgu, na taj način poboljšava koncentraciju i liječi glavobolju. Osim navedenog poznata je po svojim sedativnim, diuretskim i antiseptičkim svojstvima.

Koristi se i u kozmetičke svrhe još od davnih dana za jačanje kose ili posvjetljivanje tamne kose. Eterično ulje ružmarina treba izbjegavati u trudnoći. Najpoznatija učestala primjena mu je u kulinarstvu kao začim raznim jelima.

Fenolni spojevi prisutni u ružmarinu su flavonoidi (genkvanin, cirsimaritin i homoplantagin), fenolne kiseline (ružmarinska, klorogenska i kafeinska kiselina) i fenolni diterpeni (karnosol, karnosolna kiselina i rozmanol)⁴. Ružmarinska kiselina, karnosol i karnosolna kiselina se ističu kao najznačajniji fenolni spojevi ružmarina.



Slika 2. Prikaz kemijskih struktura: a) ružmarinska kiselina; b) karnosol; c) karnosolna kiselina

Polifenoli su bioaktivni spojevi koji se nalaze u hrani, a zahvaljujući jakim antioksidacijskim svojstvima imaju mnoge pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, zbog čega postoji veliki interes za njihovom primjenom u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Nakon oralne konzumacije je bioraspoloživost niska te lako podliježu promjenama tijekom različitih uvjeta proizvodnje pa se radi toga koristi metoda inkapsulacije⁵.

2.1.2. KADULJA

CARSTVO: Plantae

RED: Lamiales

PORODICA: Lamiaceae

ROD: Salvia

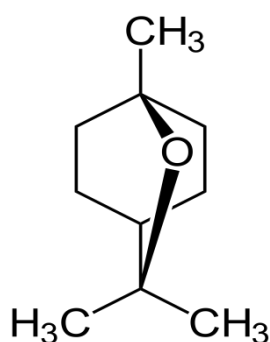
VRSTA: *Salvia officinalis* L.



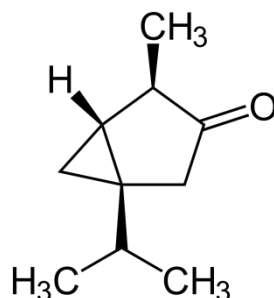
Slika 3. Kadulja

Lat. Salvia dolazi od riječi salvare što znači u prijevodu spasiti ili izliječiti. Officinalis se prevodi kao "ljekovit". Naziva se još i žalfija te je jedna od autohtonih biljnih vrsta Dalmacije proširena na području cijelog Mediterana te pokriva veliku površinu čak i najgoreg krša. Kadulji treba sunca zbog čega ne opstaje na području niske temperature. Treba se istaknuti njena medonosnost pa se koristi u ispaši pčela. Osim navedenog, eterično ulje kadulje se pokazalo izrazito antibakterijski i antivirusno zbog čega se koristi u izradi zubnih pasta, šampona, parfema i sapuna. U vrijeme cvjetanja sadrži najveću količinu kvalitetnih ljekovitih tvari⁶. Antibakterijsko djelovanje ovisno je o udjelu ukupnog tujona, 1,8-cineola i kamfora.

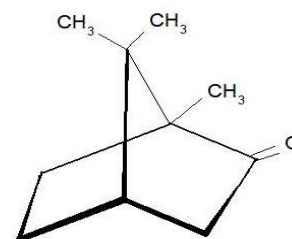
Kemijski sastav njenog eteričnog ulja ovisi o porijeklu te o mjesecu branja biljke. Komponente s najvećim udjelom u eteričnom ulju kadulje su monoterpeni α - i β - tujon, a osim njih se nađu i kamfor i 1,8-cineol. Neka kaduljina ulja sadrže i fenole, timol i karvakrol. Visoki udio tujona u eteričnom ulju razlog je njegove visoke vrijednosti pa se tako razlikuju visokokvalitetna eterična ulja koja imaju udio tujona od 41,6-61,2 % te niskokvalitetna s udjelom 22,0-39,7 %⁷. Uspoređujući uzorke eteričnog ulja kadulje s obale i iz unutrašnjosti, može se zaključiti kako je veći udio ulja u uzorcima iz unutrašnjosti otoka. Moguć utjecaj je temperatura koja je nešto niža od one uz obalu te količina svjetlosti.



Slika 4. Tujon



Slika 5. 1,8-cineol



Slika 6. Kamfor

2.1.3. ORIGANO

CARSTVO: Plantae

RED: Lamiales

PORODICA: Lamiaceae

ROD: Origanum

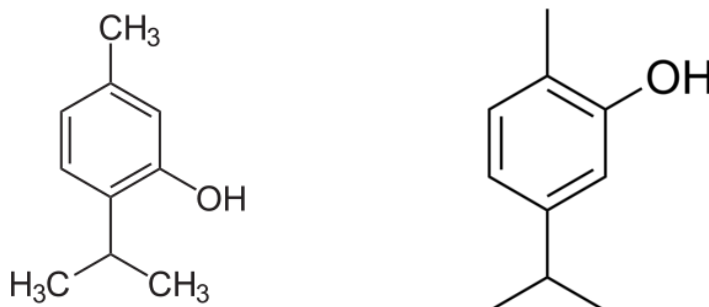
VRSTA: *Origanum vulgare* L.



Slika 7. Origano

Naziv origano potječe iz grčkih riječi oros i ganos što bi se moglo prevest kao "radost planine". Osim naziva origano alternativni izrazi su mažuran i mravinac. Pretežito je zastupljen po brdima, livadama i šikarama te voli sunčano mjesto, suho i lužnato tlo. Ima terapijsko djelovanje kod liječenja bolesti dišnih putova ili slabog apetita. Od origana se priprema čaj koji se odlikuje antibakterijskim, antivirusnim, antioksidacijskim i protuupalnim djelovanjem. Treba naglasiti kako ova biljka s bijelim cvjetovima nema ljekovito značenje.

Ulje origana je pokazalo veliku prednost antibakterijskomg djelovanja ispred ostalih aromatičnih biljaka. Osim navedenog, ulje pomaže u regulaciji šećera, uklanjanju infekcija i raznim drugim zdravstvenim problemima. U sastav ulaze eterična ulja (karvakrol i timol), flavonoidi (antioksidansi), vitamini A i C te minerali. Karvakrol predstavlja najvažniju komponentu i nosioca protumikrobnog djelovanja. To je fenolni spoj sa izrazitim antiseptičkim svojstvima. Jedan je od najjačih prirodnih antioksidansa te prestiže jabuku u tom djelovanju za 40 puta.



Slika 8. Kemijska struktura timola i karvakrola

2.1.4. TIMIJAN

CARSTVO: Plantae

RED: Lamiales

PORODICA: Lamiaceae

ROD: Thymus

VRSTA: *Thymus vulgaris* L.



Slika 9. Timijan

Alternativni naziv je majčina dušica. Thymus potječe od grčke riječi thymon, što znači hrabrost. Zbog termofilnog svojstva dobro podnosi sušu, a niske temperature mu mogu nanjeti velike štete. To je biljka koja samoniklo raste te je vrlo otporna. Ova biljka ima izražena antiseptička i antibakterijska svojstva zbog čega se ubraja u jedne od najvažnijih prirodnih sredstava za dezinfekciju. Nakon par sekundi zaustavlja razvoj štetnih mikroorganizama pa se može koristiti i za konzerviranje. Divlji timijan se odlikuje najvećim udjelom ljekovitih i aromatičnih tvari dok se u kulinarstvu najviše upotrebljava obični i limunski timijan. Prekomjerna konzumacija njegovih pripravaka dovodi do štetnih učinaka na organizam kao što su ubrzan rad štitnjače ili bolove u jetri, a u vrijeme trudnoće se izričito nebi smio koristiti da nebi došlo do pobačaja.

Eterično ulje timijana ne smije se direktno nanositi na kožu, već samo u razrijeđenom obliku. Glavni fenolni spoj ulja je timol i u manjoj mjeri karvakrol, a takav tip naziva se timolski tip. Osim njega javljaju se i linaliolski, tujanolski i geraniolski tip. Najzastupljenije komponente eteričnog ulja timijana su: timol, linalool, geraniol, karvakrol, transtujenol-4 i α -terpineol.

2.2. Biološki aktivni spojevi iz aromatičnog i začinskog bilja

2.2.1. HLAPLJIVI SPOJEVI

To su organski spojevi sa visokom vrijednosti tlak para pri sobnoj temperaturi. Uzrok tome je niska temperatura vrelišta. Molekule prelaze u plinovito stanje, isparavanjem ili sublimacijom.

Izvor hlapljivih spojeva predstavljaju boje i premazi (glavni sastav čine etil-acetat, glikol-eter i aceton), fosilna goriva, benzen, diklormetan (DCM), tetrakloreten i formaldehid. Neki od njih utječu na zdravlje, dovode do iritacije očiju, sluznice nosa i grla. Osim toga doprinose stvaranju troposferskog ozona i smoga.

SPME tehnika je korištena za skupljanje hlapljivih spojeva niskih koncentracija iz uzorka, a nakon nje kroz injektor ulaze u plinski kromatograf kako bi se određene komponente odredile (MS služi kao detektor).

2.2.2. FENOLNI SPOJEVI

Spojevi koji su građeni od aromatskog, benzenovog prstena i direktno vezane 1 ili više hidroksilne (-OH) skupine. Fenolni spojevi su glavni predstavnici sekundarnih biljnih metabolita⁸. Polifenoli su spojevi fenola koji imaju više benzenskih prstenova. Kao što je već ranije spomenuto, fenolni spojevi su sastavnice eteričnih ili esencijalnih ulja (timol i karvakrol), a osim toga se javljaju i vezani za šećere pri čemu tvore glikozide.

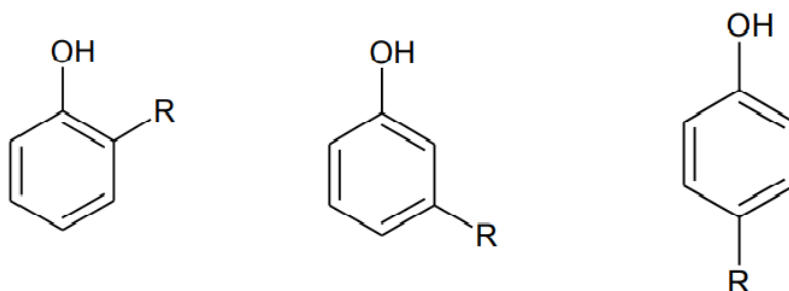
U svakom slučaju oni su u biljkama vezani za stanicu membrane ili mogu biti slobodni. Za preradu namirnica kada se koriste jako visoke ili niske temperature dolazi do otpuštanja fenolnih spojeva što ih s druge strane ih čine više raspoloživima ljudskom tijelu⁸.

Podijela prema kemijskoj strukturi²⁴:

- 1) Fenolne kiseline (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne)
- 2) Flavonoidi (flavonoli, flavoni, flavanoli, antocijani i drugi)
- 3) Tanini (kondenzirani i hidrolizirani)
- 4) Ostali polifenolni spojevi (lignani, kumarini)

Podijela prema broju C-atoma:

Jednostavni fenoli, C6 spojevi – najjednostavniji spojevi su fenol i supstituirani fenoli.



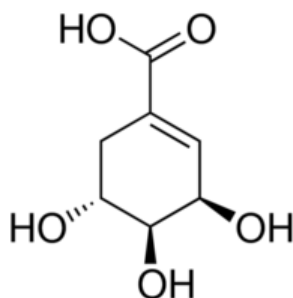
Slika 10. Supstiturani fenoli

Druga skupina su fenolne kiseline i aldehidi C6-C1 - p-hidroksibenzojeva kiselina, salicilna kiselina, galna kiselina vanilinska kiselina vanilin.

Iduća skupina su acetofenoni i fenilacetatne kiseline C6-C2; cimetne kiseline (hlorogenska kiselina) te kumarini i izokumarini C6-C3; C6-C3-C6; Biflavonili C30 i ostali.

Fenolni spojevi imaju razne uloge, mogu biti signalne molekule, pigmenti, boje, zaštita biljaka ili kao bioaktivne supstance. Mnoga istraživanja su potvrdila jaku vezu između fenolnih spojeva i antioksidacijskog djelovanja voća i povrća.

Antioksidacijsko djelovanje veže se za hidroksilne skupine zbog toga što su dobri proton donori koji mogu reagirati s reaktivnim kisikom i dušikom i tim putem spriječiti nastanak novih radikala⁹. Polifenoli djeluju tako da inhibiraju enzime koji povećavaju oksidacijski stres. Što se tiče kiselosti, fenolni spojevi spadaju u slabe kiselilne. Biosintetski put aromatskih spojeva u višim biljkama uglavnom se odvija preko šikiminske kiseline (put pentoza-fosfat i glikoliza).



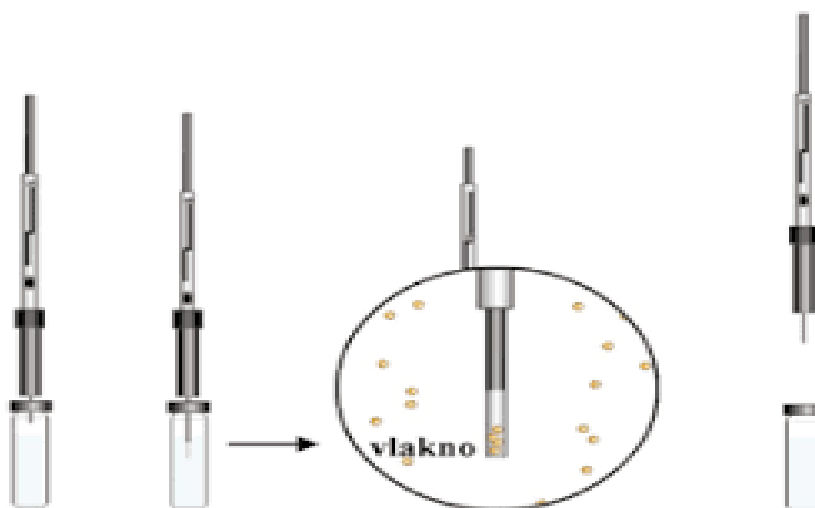
Slika 11. Kemijska struktura šikiminske kiseline

2.3. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi i plinska kromatografija

Mikroekstrakcija SPME (Solid Phase Microextraction, SPME) je metoda koja služi za koncentriranje i ekstrahiranje hlapljivih spojeva iz uzorka kako bi se kasnije lakše odredili plinskom kromatografijom. Ova metoda se posebno koristi kod uzoraka koji inače sadrže veliki broj različitih hlapljivih tvari u vrlo niskim koncentracijama¹⁰.

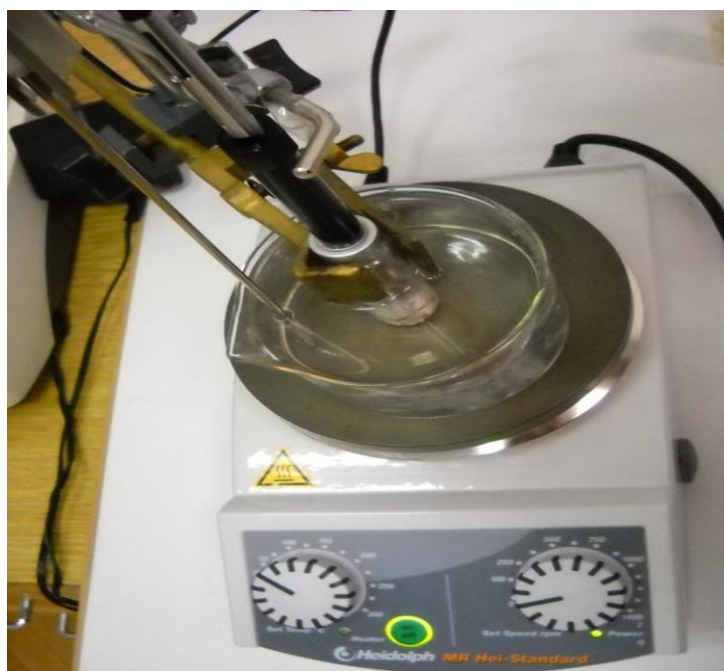
Razlikuju se dvije vrste ove metode, a to su: natprostora (eng. headspace-SPME, HS-SPME) i direktnog uranjanja (eng. direct immersion-SPME, DI-SPME).

Kod HS-SPME vlakno je izloženo hlapljivoj fazi iznad plinovitog, tekućeg ili čvrstog uzorka dok je kod DI-SPME vlakno je direktno uronjeno u uzorak.



Slika 12. HS-SPME i DI-SPME

Osnovni dio SPME sistema predstavlja 1cm dugo vlakno smješteno unutar igle. Napravljeno je odgovarajućeg polimera nanesenog na nosač od otopljenog SiO_2 ¹². Igla se uroni u uzorak ili stavi iznad uzorka na određeno vrijeme, a nakon apsorpcije analita unese se u sustav plinskog kromatografa.



Slika 13. Aparatura za HS-SPME

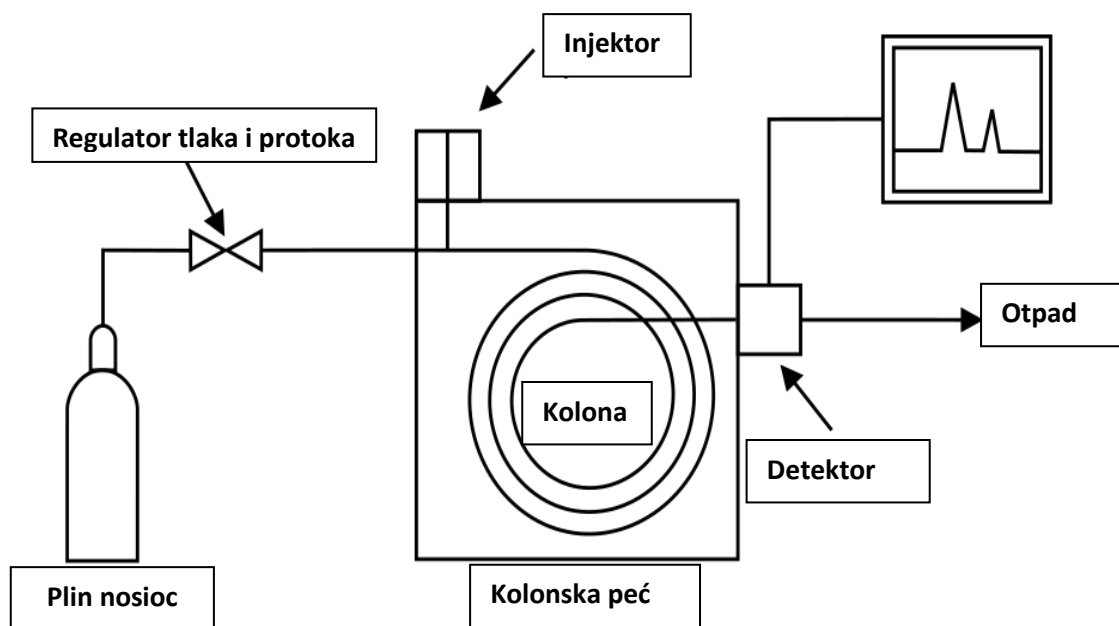
Proces mikroekstrakcije se zasniva na selektivnoj sorpciji ciljanih analita u aktivnom sloju vlakna i direktnoj desorpciji u injektoru kromatografa, tj. na raspodjeli analita između matrice uzorka i omotača vlakna¹³. Metoda ne zahtijeva puno vremena za analizu, zahtijeva samo male količine uzorka, ima izraženu selektivnost te se ne koriste organska otapala. Važna pozitivna strana ove tehnike su niska cijena, jednostavnost i to što je pogodna za veći broj uzoraka. S druge strane ima ograničen kapacitet vlakana, komponente velike molekulske mase mogu se ireverzibilno vezati na vlakna (tako mu mogu promijeniti njegova svojstva), mogu nastati mjehurići plina na površini vlakna (tako mogu poremetiti osjetljivost metode).

Istraživanja pokazuju da su u većini slučajeva vlakna sa izrazito nepolarnim (PDMS) i izrazito polarnim (PA) aktivnim slojevima najučinkovitija. Tip vlakna koji se koristi utječe na selektivnost ekstrakcije pa se tako polarna vlakna koriste se za polarne spojeve, a nepolarna za nepolarne spojeve¹⁴. PA je izrazito polarna faza, što znači da je pogodan za analizu polarnih spojeva, a PDMS je učinkovit za uzorkovanje nepolarnih spojeva.

Ekstrakcija SPME se može smatrati gotovom kada koncentracija analita dospije do ravnotežnog stanja između matrice uzorka i omotača vlakna¹⁵.

Nakon određenog vremena ekstrakcije vlakno se uvlači u iglu koja se izvlači iz septuma i direktno uvodi u ulaz injektora plinskog kromatografa (GC)¹⁵. SPME vlakna se nalaze u spremniku za vrijeme nekorisćenja i tako se vlakna čuvaju.

PLINSKA KROMATOGRAFIJA :



Slika 14. Shema plinske kromatografije

SASTAVNICE GC-a : Rezervoar s plinom nosačem

Regulator tlaka i protoka

Injektor

Stupac

Detektor

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja komponenata smjese temeljem različite raspodjele komponenata između dviju faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne)¹⁶. Analizirani uzorak je u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza.

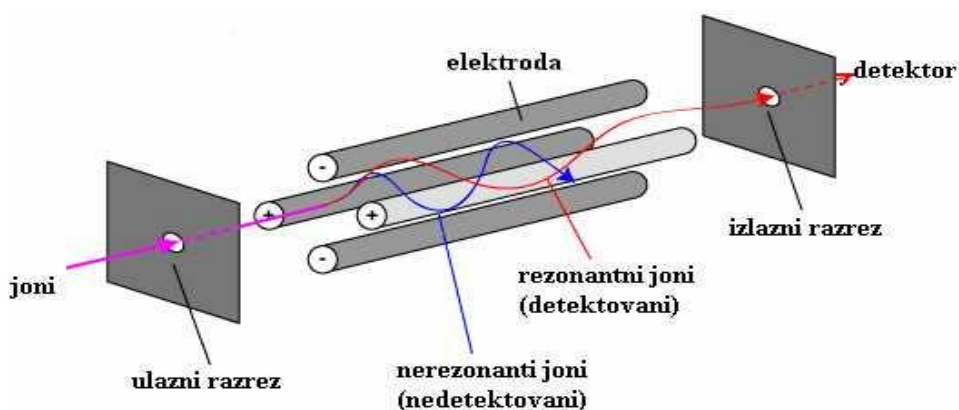
Razlikuju se 2 osnovne vrste plinske kromatografije, a to su adsorpcijska i razdjelna koja se koristi u većini slučajeva.

Mobilnu fazu čini inertni plin (N_2 , He, Ar, H_2) koji ispire komponente smjese u koloni napunjenoj stacionarnom fazom. Za razliku od tekućinske kromatografije u plinskoj kromatografiji analit ne reagira s mobilnom fazom.

Stacionarna faza je čvrsta tvar na koju se adsorbiraju analizirane komponente. Faza je nanesena na površinu čvrstog nosača adsorpcijom ili kemijskim vezanjem.

Aanalizirani uzorak ulazi u kromatograf putem injektora koji omogućuje miješanje uzorka s plinom nosiocem koji odnosi različite sastavnice uzorka na kolonu. Uzorak ulazi u kapljevito stanju, ali zbog visoke temperature u kromatografu prelazi u plinovito stanje. Temperatura se namjesti da bude viša za 50 °C od temperature vrelišta najslabije hlapive komponente. Visoka temperatura i struja inertnog plina pomažu da se otklone tvari koje bi mogle onečistiti uzorak. Osim navedenog, visoka temperatura sprječava kondenzaciju uzorka na putu do detektora¹⁶.

Fragmentacijom (lat. divisio – podjela, dioba) dolazi do cijepanja molekule. Fragmenti uzorka su raspodijeljeni prema omjeru mase i naboja, m/z , prilikom čega većina detektiranih fragmenata ima naboj +1. Nabijeni molekulski ion i fragmenti prolaze kroz analizator koji ih raspoređuje prema omjeru m/z ¹⁷. Kao detektor u plinskoj kromatografiji koristi se maseni spektrometar (MS; GC-MS). Molekula je bombardirana strujom elektrona visoke energije.



Slika 15. Shema kvadrupolnog analizatora

OPĆE REAKCIJE FRAGMENTIRANJA¹⁷: 1) jednostavna cijepanja

2) pregrađivanja

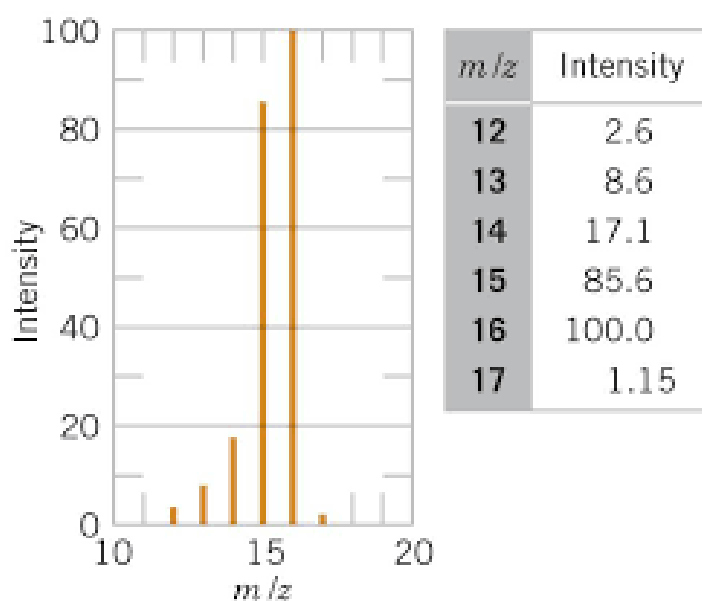
3) cijepanja blizu dvostruke veze

4) cijepanja u susjedstvu heteroatoma

PRIKAZ MASENOG SPEKTRA:

Intenzitet u ovisnosti o omjeru mase i naboja. Najviši pik naziva se osnovnim i njemu se pripisuje intenzitet od 100%.

Retencijsko vrijeme je vrijeme injektiranja uzorka pojave signala na detektoru. Svaka tvar ima svoje vrijeme zadržavanja te je karakterističan parametar za svaku komponentu. Impulsi detektora prenose se preko pojačala na računalo koji nam daje kromatogram¹⁸.



Slika 16. Prikaz masenog spektra

2.4. Tehnike inkapsulacije u cilju stabilizacije biološki aktivnih spojeva

Inkapsulacija je postupak kojim se aktivna komponenta obavije kako bi se očuvala njezina funkcionalna svojstva. Temeljena je na taloženju sa superkritičnim fluidima i relativno nedavno je tek razvijena¹⁹.

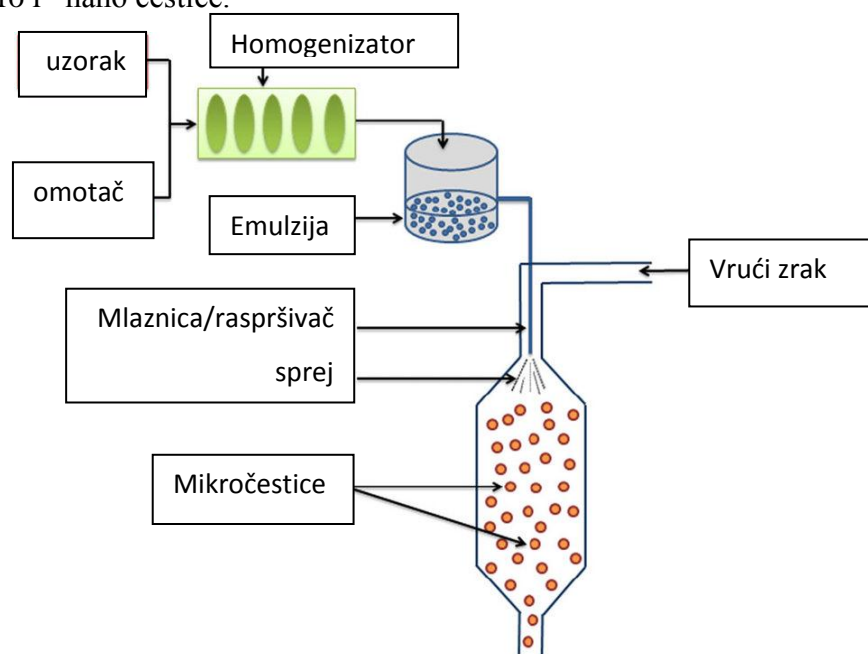
Inkapsulirati se mogu bioaktivne komponente poput antioksidansa, vitamina, fitosterola, mineralnih tvari, masnih kiselina i živih stanica, kao što su probiotici²⁰. Omotač oko inkapsulirane tvari omogućava separaciju jezgre od okoliša sve dok tvar ne bude otpuštena u okolinu u određenim uvjetima i kontroliranom brzinom²¹.

Prirodni polimeri se koriste kao nosači za inkapsulaciju naročito kad se radi tehnikom ionskog geliranja. Biokompatibilnost i biorazgradivost su temeljne karakteristike koje ih

čine pogodnima. Neki od njih su: alginat, fibrin, želatina, kolagen, pektin, karboksimetil celuloza i drugi. U ovom istraživanju su korišteni proteinski nosači sirutke i soje te su se usporedile razlike u rezultatima. Nosači sadrže katione ili anione i tvore unakrsne veze sa suprotno nabijenim ionima.

Na temelju reakcija koje se odvijaju prilikom procesa razlikujemo fizikalne, fizikalno-kemijske te kemijske metode inkapsuliranja²².

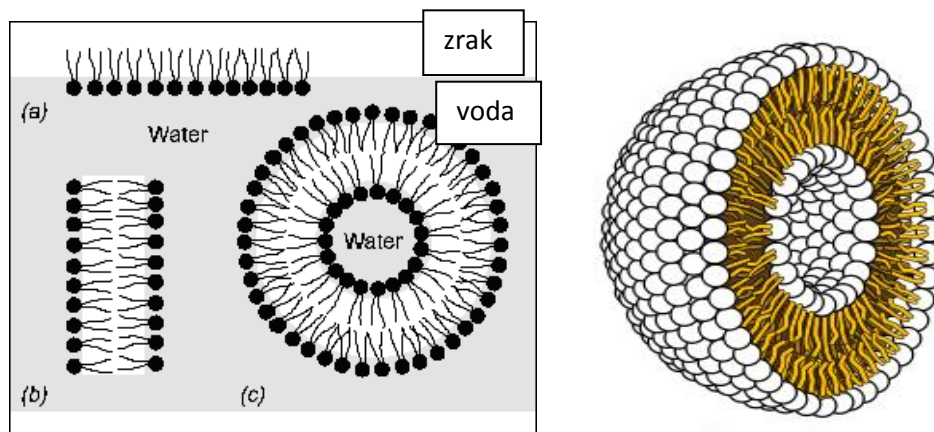
1. FIZIKALNE → Sušenje raspršivanjem („spray drying“) jedna je od najstarijih i najšire korištenih inkapsulacijskih tehnologija u prehrambenoj industriji. Karakteriziraju je jednostavno izvođenje i niska cijena. Odvija se proces atomizacije, a ono predstavlja razbijanje tekućine na kapljice. Vršiti se pritiskom otopine kroz mlaznicu. Kao produkti nastaju -mikro i -nano čestice.



Slika 17. Sušenje raspršivanjem (engl. Spraydrying)

2. FIZIKALNO-KEMIJSKE

U ovoj metodi je naglašena proizvodnja liposoma. To su dvoslojne čestice nastale iz kolesterola i fosfolipida.



Slika 18. Liposom

3. KEMIJSKE METODE

Kompleksna koacervacija podrazumijeva razdvajanje otopine sastavljene od dva suprotno nabijena iona na dvije tekuće faze koje se ne miješaju. Pri tome dolazi do spajanja suprotno nabijenih iona oko aktivne komponente.

Cilj inkapsulacije je čuvanje lako hlapljivih komponenata (aroma), zaštita sastojaka tijekom skladištenja i transporta te zaštita tijekom tehnoloških procesa²³.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci i priprema

Istraživanje je provedeno na 4 aromatične biljke Mediterana ružmarinu, kadulji, origanu i timijanu. Biljke su sakupljene u proljeće 2017. godine na području Splita. Prije postupka inkapsulacije biljni materijal podvrgnut je postupku sušenja na sobnoj temperaturi, u zatamnjenom prostoru (temperatura nije prelazila 18 °C). U potpunosti osušeni biljni materijal nakon toga podvrgnut je liofilizaciji na liofilizatoru (FDL-10N-50.8 Mrclab, Israel) pod tlakom od 0,15 do 0,20 mbar i temperaturi od – 41 °C. Nakon postupka liofilizacije uzorci su samljeveni u sitni prah i pohranjeni u staklenim bočicama na sobnoj temperaturi.

3.2. Postupak inkapsulacije

Za mikroinkapsulaciju vodenih biljnih ekstrakata se koristio uređaj za sušenje raspršivanjem, engl. Spray dryer (Büchi mini B-290, Büchi Labortechnik AG, Switzerland) (Slika X), sa dijametrom igle od 0,7 mm, temperaturom ulaznog (130 ± 3 °C) i izlaznog (68 ± 2 °C) zraka, relativno slabim protokom zraka (600 L/h), protokom tekućine (8 mL/min), pritiskom atomizacije (6 psi). Niska temperatura izlaznog zraka je izabrana s ciljem da osigura dobru atomizaciju čestica i dobar protok tekućine kako bi se dobile mikročestice koje su stabilne (što je i najvažnije, posebno za hlapive aktivne spojeve biljaka koji su osjetljivi na visoke temperature) i postigla visoka efikasnost inkapsulacije. Za inkapsulaciju su korišteni proteini sirutke i proteini soje (10% v/v). Nakon što se završila mikroinkapsulacija metodom sušenja raspršivanjem, formirane mikročestice su prikupljene u tube, a potom čuvane u plastičnim hermetičkim bočicama, na sobnoj temperaturi u eksikatoru sa silica gelom, do analiziranja. Na slici XX prikazan je uređaj za raspršivanje sprejem (Poljoprivredni fakultet Sveučilišta u Beogradu).



Slika 19. Uređaj za raspršivanje sprejem

3.3. Određivanje hlapljivih spojeva iz uzoraka

Putem istraživanja se utvrdilo kako je sivo vlakno najpogodnije vlakno za apsorpciju vršnih para (s filmom divinilbenzen/carboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS)).



Slika 20. Sivo vlakno

U staklenu posudu od 15 mL stavi se 1g uzorka. Posuda se hermetički zatvori teflonskom PTFE/silikon septom te postavi u vodenu kupelj (60 °C), s termostatom.

Prije upotrebe sivo vlakno je aktivirano kondicioniranjem 60 min pri 270 °C i to postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa. Nakon kondicioniranja vlakno je odmah korišteno za ekstrakciju vršnih para uzoraka¹¹.

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min), SPME igla je postavljena u posudu, a vlakno sakuplja vršne pare u vremenu od 40 min. Nakon uzorkovanja, SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz posude i odmah postavljeno u GC-MS injektor (250 °C, 7 min), gdje je provedena toplinska desorpcija ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu.

Određivanje hlapljivih spojeva provelo se spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS), koristeći plinski kromatograf u kombinaciji s masenim detektorom spojenim na računalo.



Slika 21. Plinski kromatograf

Separacija komponenti provedena je na kapilarnoj koloni HP-5MS.

Korišteni uvjeti rada plinskog kromatografa za HP-5MS koloni¹³:

- temperaturni program kolone: 2min izotermno na 70 °C, zatim porast temperature od 70 °C do 200 °C za 3 °Cmin⁻¹,
- temperatura injektora: 250 °C,
- omjer cijepanja je 1 : 50,
- plin nositelj: helij s protokom 1 mLmin⁻¹

Uvjeti rada spektrometra masa:

- energija ionizacije: 70 eV,
- temperatura ionskog izvora: 230 °C,
- interval snimanja masa: 30-350 masenih jedinica

Pojedinačni pikovi identificirani su usporedbom njihovih retencijskih indeksa (u odnosu na C₈-C₃₀ *n*-alkane za HP-5MS kolonu) s onima iz literature, kao i uspoređivanje njihovih spektara masa s Wiley 09 MS library i NIST14 (National Institute of Standards and Technology) bazom podataka. Postotci identificiranih komponenti iz uzoraka su izračunati iz površine pikova.

3.4. Određivanje udjela ukupnih fenola

Određivanje ukupnih fenola u uzorcima provedeno je prema metodi Singleton i Rossi (1965). U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 1 mL uzorka (ukoliko se po boji zaključi da je bogat fenolima, može se razrijediti u omjeru 1:10), a potom se doda 60 mL destilirane vode i 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (reagens se prethodno pripremi na način da se napravi razrjeđenje 1 dio reagensa i 2 dijela destilirane vode). Za provedbu ovog eksperimenta korištena je koncentracija biljnih uzoraka od 5 mg/mL. Smjesa se dobro promućka i u intervalu od 30 sekundi do 8 minuta doda se još 15 mL natrijevog karbonata (Na₂CO₃) i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Otopina se ostavi, da odstoji 2 sata na sobnoj temperaturi, a potom se izmjeri absorbancija na 765

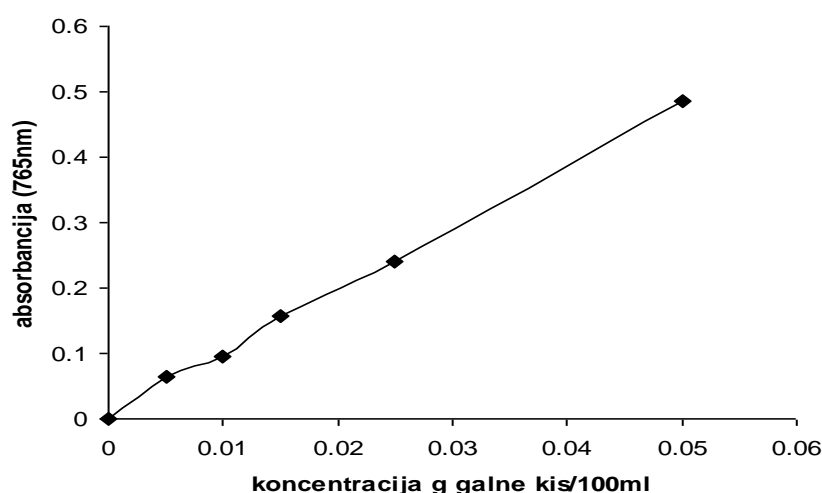
nm. Iz baždarne krivulje očita se vrijednost ukupnih fenola izraženih kao ekvivalenti galne kiseline (GAE). U slučaju kada je uzorak razrijeđen, rezultat se pomnoži s faktorom razrjeđenja.

Priprava standardne otopine galne kiseline:

Standardna otopina galne kiseline pripravlja se miješanjem 0,5 g galne kiseline s otprilike 10 mL 96 % -tnog etanola, a smjesa se otopi u tikvici od 100 mL u destiliranoj vodi. Iz tikvice se uzima po 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL i 10 mL otopine i otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL, doda 60 mL vode i 5 mL prethodno pripremljenog Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se potom dobro promućka i u intervalu od 30 sekundi do 8 minuta u tikvicu se doda još 15 mL natrijevog karbonata (Na_2CO_3) i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Ostavi se da odstoji 2 sata na sobnoj temperaturi i zatim se očita apsorbancija na 765 nm. Odmjerna tikvica bez uzorka je slijepa proba i služi za određivanje nule na spektrofotometru.

Priprava 20 %-tne otopine Na_2CO_3 :

20 % -tna otopina Na_2CO_3 priprema se tako da se otopi 200 g bezvodnog Na_2CO_3 u 800 mL destilirane vode i stavi se malo zagrijati. Otopina se potom ohladi na sobnu temperaturu, doda se malo kristalića Na_2CO_3 i ostavi da se taloži 24 sata. Nakon toga se filtrira i nadopuni do volumena 1 L.



Slika 22. Graf ovisnosti apsorbancije (765nm) o koncentraciji galne kiseline (g/100mL)

4. REZULTATI

Tablica 1. Kemijski spojevi dobiveni iz inkapsuliranih uzoraka ružmarina, kadulje, origana i timijana metodom HS-SPME/GC-MS metodom

	KEMIJSKI SPOJ	RI	1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Etanol	< 900	-	-	0,5	-	-	-	0,8	0,4
2.	Metiltiometan	< 900	0,5		1,0	-	-	-	-	-
3.	Octena kiselina	< 900	14,9	1,6	11,0	-	-	-	0,4	-
4.										
5.	Heksanal	< 900	-	-	-	-	-	-	3,8	0,7
6.	α-Pinen	942	-	-	0,8	-	-	-	1,2	-
7.	Benzaldehid	968	0,5	-	-	-	-	-	-	-
8.	Okt-1-en-3-on	982	-	-	-	-	-	-	1,4	-
9.	Heksanska kiselina	988	6,3	-	1,2	-	1,2	-	-	-
10.	Oktanal	1006	-	-	-	-	-	-	1,2	-
11.	<i>p</i>-Cimen	1030	-	-	-	2,6	-	-	0,8	2,1
12.	Limonen	1035	-	-	-	-	-	-	1,2	-
13.	2-Etilheksan-1- ol	1036	5,5	1,2	8,4	-	-	-	-	-
14.	1,8-Cineol	1038	3,4	-	8,1	-	-	-	14,2	-
15.	Benzil-alkohol	1045	0,5	-	-	-	-	-	-	-
16.	<i>cis</i>-Sabinen hidrat	1073	-	-	-	-	-	-	-	1,7
17.	Nonanal	1107	1,4	-	-	-	-	-	2,5	-
18.	α-Tujon	1111	7,0	-	-	-	19,2	-	-	-

19.	β-Tujon	1122	5,3	-	-	-	16,9	-	-	-
20.	Kamfor	1150	4,1	-	14,2	0,3	4,9	-	19,6	1,2
21.	Borneol	1172	6,0	-	7,6	3,5	11,7	-	9,3	6,7
22.	Terpinen-4-ol	1181	-	-	3,8	0,5	-	-	-	1,8
23.	<i>p</i>-Cimen-8-ol	1190	-	-	-	0,5	-	-	-	-
24.	α-Terpineol	1194	-	-	-	-	-	-	3,8	-
25.	Metil-timil-eter	1239	-	-	-	-	-	-	-	0,9
26.	Bornil-acetat	1288	4,3	31,6	9,2	48,8	3,9	30,5	7,9	36,2
27.	Timol	1294	1,2	58,2	-	30,1	2,7	58,3	6,3	21,0
28.	Karvakrol	3310	3,1		12,2		8,0		12,4	
29.	Dodekanal	1411	-	0,4	-	-	-	-	-	-
30.	<i>trans</i>-Kariofilen	1422	-	-	-	0,2	-	-	1,2	-
31.	Kariofilen oksid	1583	8,9	0,6	-	-	-	0,3	-	1,9
32.	Viridiflorol	1593	-	-	-	-	12,4	-	-	-

RI = Retencijski indeks (umjesto njega se moglo koristiti retencijsko vrijeme, Rt)

1. kadulja - nosač soja, inkapsulacija
2. origano - nosač soja, inkapsulacija
3. ružmarin - nosač soja, inkapsulacija
4. timijan - nosač sirutka, inkapsulacija
5. kadulja - nosač sirutka, inkapsulacija
6. origano - nosač sirutka inkapsulacija
7. ružmarin - nosač sirutka inkapsulacija
8. timijan - nosač soja inkapsulacija

Tablica 2. Udio ukupnih fenola u inkapsuliranim biljnim uzorcima

Uzorci	Ukupni fenoli mg/L GAE
1	346,36
2	383,85
3	213,31
4	215,94
5	189,54
6	227,03
7	219,11
8	266,63

- 1 – origano inkapsuliran s proteinima soje;
- 2 – origano inkapsuliran s proteinima sirutke;
- 3 – timijan inkapsuliran s proteinima soje;
- 4 – timijan inkapsuliran s proteinima sirutke;
- 5 – kadulja inkapsulirana s proteinima soje;
- 6 – kadulja inkapsulirana s proteinima sirutke;
- 7 – ružmarin inkapsuliran s proteinima soje;
- 8 – ružmarin inkapsuliran s proteinima sirutke

5. RASPRAVA

Aromatične biljke predmet su brojnih istraživanja zbog svojih raznih pozitivnih djelovanja. To područje smo obogatili komparativnim istraživanjem udjela hlapivih spojeva inkapsuliranih uzoraka na proteinskim nosačima sirutke i soje.

Rezultati priloženi u tablici 1 pokazuju nam udio pojedinog hlapivog spoja u ružmarinu, kadulji, origanu i timijanu na jednom od nosača. Iz rezultata se lako može vidjeti razlika kemijskog sastava u odnosu na različitu vrstu biljnog materijala, ali i u odnosu na različitu vrste proteinskog nosača u postupku inkapsulacije.

Prema rezultatima kadulje možemo primjetiti kako je više hlapljivih spojeva zastupljeno u uzorku kadulje na nosaču soje nego u uzorku kadulje na nosaču sirutke. Neki hlapljivi spojevi koji se javljaju u uzorku na nosaču sirutke postotkom premašuju isti taj spoj samo na nosaču soje. U uzorku kadulje na nosaču soje prevladavaju hlapljivi spojevi octena kiselina (14,9 %), kariofilen oksid (8,9 %) i α -tujon (7 %). Na nosaču sirutke, iste biljke, najzastupljeniji su α -tujon (19,2 %), β -tujon (16,9 %) i viridiflorol (12,4 %). Viridiflorol je jedini hlapljivi spoj koji se pojavio na nosaču sirutke (kadulja), ali ne i na nosaču soje. U odnosu na neinkapsulirane uzorke kadulje (liofilizirane i osušene sprejem) došlo je promjene u kemijskom sastavu hlapivih spojeva u odnosu na inkapsulirane uzorke kadulje na način da kod inkapsuliranih uzoraka kadulje (na nosaču sirutke) nije detektiran spoj 1,8-cineol čija je koncentracija kod liofiliziranog uzorka kadulje iznosila 12,8 %, a kod uzorka osušenog sprejem je iznosila 3,3 %²⁵.

Prema rezultatima origana vidimo kako se i tu neki spojevi javljaju samo na nosaču soje. Kod origana nije zastupljeno puno vrsta različitih hlapivih spojeva. Uzorak origana na nosaču soje i na nosaču sirutke posjeduju najviše timol (58,2 %) – (58,3 %) i bornil-acetat (31,6 %) - (30,5 %) i to u sličnim postocima. U odnosu na liofilizirani uzorak origana kod inkapsuliranog uzorka vodenog ekstrakta origana te kod neinkapsuliranog uzorka origana koji bio tretiran postupkom sušenja sprejem nije detektiran dominantni spoj karvakrol čija je koncentracija kod liofiliziranog uzorka origana iznosila 48,6 %. Iz toga je vidljivo da postupak sušenja sprejem koji se koristio za postupak inkapsulacije dovodi do nestanka ovog dominantnog spoja kod origana i timijana²⁵. Također je iz rezultata vidljivo da se koncentracija timola povećala kod inkapsuliranih uzoraka origana u odnosu na udio kod liofiliziranog uzorka origana (30,1 %) koji nije bio inkapsuliran.

Prema rezultatima ružmarina vidimo kako se stvar mijenja te je više različitih vrsta hlapivih spojeva prisutno u uzorku ružmarina na nosaču sirutke u odnosu na nosač soje. Na nosaču soje zastupljeni su idući hlapivi spojevi :kamfor (14,2 %), karvakrol (12,2 %) i octena kiselina (11 %), a na nosaču sirutke: kamfor (19,6 %), 1,8-cineol (14,2 %), karvakrol (12,4 %). Uspoređujući ove rezultate s rezultatima analize hlapivih spojeva liofiliziranog i sprejem osušenog ekstrakta ružmarina uočava se razlika u kemijskom sastavu na način da je udio kamfora veći kod inkapsuliranih uzoraka u odnosu ne-inkapsulirane uzorke, te da kod neinkapsuliranih uzoraka nema karvakrola. Razliku uočavamo i kod udjela 1,8-cineola koji se povećao kod inkapsuliranog uzorka ružmarina, a kod sprejem osušenog ekstrakta udio 1,8-cineola iznosio je samo 3,9 %²⁵.

Prema rezultatima timijana vidimo da se ponavlja situacija kao kod prva dva uzorka, više je hlapivih spojeva na nosaču soje. Bornil-acetat (36,2 %) i timol (21 %) su najzastupljeniji spojevi u uzorku timijana na nosaču soje kao i kod nosača sirutke, ali u drukčijim udjelima, bornil-acetat (48,8 %) i timol (30,1 %). U odnosu na rezultate liofiliziranih i sprejem osušenih uzoraka timijana, vidljivo je da kod inkapsuliranih uzoraka timijana nedostaje spoj karvakrol čija je koncentracija kod liofiliziranog uzorka timijana iznosila 13,4 %, a kod sprejem osušenog uzorka 21,4 %. S druge strane, bornil-acetat i timol koji su zastupljeni u inkapsuliranim uzorcima imaju izraženo manji udio kod neinkapsuliranih uzoraka. Dakle, došlo je velike promjene u kemijskom sastavu hlapivih postupkom inkapsulacije²⁵.

Rezultati u Tablici 2. prikazuju udio ukupnih fenola inakapsuliranog biljnog materijala određen spektrofotometrijskom Folin-Ciocalteu metodom. Najveći udio ukupnih fenola pokazao je vodeni ekstrakt origana (346,36 i 383,85 mg/L GAE). Ostali uzorci su pokazali prosječan udio ukupnih fenola od 222 mg/L GAE. Iz prikazanih rezultata je također vidljivo da je udio ukupnih fenola bio nešto veći kod uzoraka inakapsuliranih s proteinima sirutke u odnosu na proteine soje. Dobiveni rezultati udjela ukupnih fenola inkapsuliranih uzoraka biljaka razlikuju se u odnosu na udio fenola kod neinkapsuliranih biljaka (liofiliziranih i osušenih sprejem) na način da je taj udio bio puno veći kod neinkapsuliranih uzorka (kod liofiliziranog origana je iznosio 602,97 mg/L GAE u uzorku koncentracije 5 mg/mL, dok je kod sprejem osušenog origana iznosio čak 1398,14 mg/L GAE). Iz ovoga proizlazi da postupak inkapsulacije, ne postupak sušenja sprejem utječe na smanjenje udjela ukupnih fenola²⁵.

6. ZAKLJUČAK

- Između nosača soje i sirutke korištenih u postupku inkapsulacije vodenih ekstrakata timijana, ružmarina, origana i kadulje postoje neke minimalne razlike koje dovode do promjena u kemijskom sastavu hlapivih spojeva vodenih ekstrakata
- Nosač sirutke u odnosu na nosač soje utjecao je na veću koncentraciju spojeva α -tujona, kamfora i timola
- Kod uzoraka inkapsuliranih na nosač sirutke udio ukupnih fenola bio je nešto veći u odnosu na uzorke inkapsulirane na nosač soje
- U usporedbi s rezultatima kemijskog sastava i udjela ukupnih fenola neinkapsuliranih uzorka vodenih ekstrakata biljaka (liofiliziranih i sprejem osušenih) postupkom inkapsulacije došlo je značajnih promjena. Koncentracija timola i kamfora bila je veća kod inkapsuliranih uzoraka. Nadalje, postupak inkapsulacije utječe na smanjenje udjela ukupnih fenola.

7. LITERATURA

1. URL: <http://www.biljke.hr/aromaticne-biljke/> (03.09.2018.)
2. URL: <https://repozitorij.pfos.hr/islandora/object/pfos:184/preview>
(03.09.2018.)
3. Roman Ozimec, Frane Strikić, Jasminka Karoglan Kontić, Edi Maletić, Zdravko Matotan (2015) Tradicijske sorte i pasmine dalmacije
4. URL: <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pbf%3A2716/datastream/PDF/view>
(04.09.2018.)
5. URL: <https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:1717/preview>
(04.09.2018.)
6. URL: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Kadulja> (04.09.2018.)
7. URL: <https://repozitorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma:221/preview>
(05.09.2018.)
8. Igor Otavio Minatel, Cristine Vanz Borges, Maria Izabela Ferreira, Hector Alonzo Gomez Gomez, Chung-Yen Oliver Chen and Giuseppina Pace Pereira Lima (2017) Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability
9. URL: <https://repozitorij.unios.hr/islandora/object/kemos:32/preview>
(05.09.2018.)
10. Karolina Brkic Bubola, Olivera Koprivnjak, Barbara Sladonja, Dubravka Škevin, Ivana Belobrajic (2012) Utjecaj roka berbe na sastav i kvalitetu djevicanskih maslinovih ulja sorte Rosinjola
11. Zvonimir Marijanović (2014) Primjena ultrazvučne ekstrakcije otapalom i mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi za karakterizaciju meda
12. URL: <https://repozitorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos%3A1210/datastream/PDF/view>
(06.09.2018.)
13. Janusz Pawliszyn (1997) Solid Phase Microextraction: Theory and Practice

14. URL:<https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf%3A309/datastream/PDF/view> (06.09.2018.)
15. Kataoka H1, Lord HL, Pawliszyn J. **(2000)** Applications of solid-phase microextraction in food analysis
16. Radić i Kukoč Modun **(2017)** Uvod u analitičku kemiju
17. URL:https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Nastavni_tekst_Molekulska_spektroskopija.pdf (07.08.2018.)
18. URL: <https://zir.nsk.hr/islandora/object/fkit:150/preview> (07.08.2018.)
19. Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Randelović, S. S., Đorđević, A. S. **(2014)** Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. Fruit
20. Fang Z., Bhandari B. **(2010)** Encapsulation of polyphenols – A review. Trends in Food Science Technology
21. Desai K. G. H., Park H. J. **(2005)** Recent developments in microencapsulation of food ingredients
22. Munin A, Edwards-Lévy F.**(2011)** Encapsulation of natural polyphenolic compounds
23. URL:<https://repozitorij.pbf.unizg.hr/islandora/object/pbf:1717/preview> (08.09.2018.)
24. Naczki M. and Shahidi F. **(2006)** Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables Occurrence, Extraction and Analysis
25. Viktorija Jurić **(2018)** Završni rad: Određivanje hlapljivih spojeva i ukupnih fenola iz ružmarina, kadulje, origana i timijana nakon postupka liofilizacije i sušenja sprejem